ICS ：
中国标准文献分类号：X 16

T/SSFS

团 体 标 准

T/ SSFS 00XX—20XX

蛋白肽粉类产品品质的多级红外光谱快速评价方法

A rapid evaluation method for quality determination of protein peptide powder products by multi-step infrared spectroscopy

(征求意见稿)

20XX- XX -XX 发布 20XX- XX - XX 实施

上 海 市 食 品 学 会 发 布

前 言

本文件按照 GB/T 1.1-2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件中附录A、B为规范性附录，附录C为资料性附录。

本文件由上海市食品学会提出、归口并组织实施。

本文件起草单位：xxx、xxx、xxx。

本文件主要起草人：xxx、xxx、xxx。

本文件承诺执行单位：xxx、xxx、xxx。

声明：本文件的知识产权归属于上海市食品学会，未经上海市食品学会同意，不得印刷、销售。任何组织、个人使用本标准开展认证、检测等活动应经上海市食品学会批准授权。本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

蛋白肽粉类产品品质的多级红外光谱快速评价方法

1 范围

本标准规定了蛋白肽粉类产品中蛋白肽以及异杂成分（糖类、脂类、雌酮、乙烯雌酚、倍他米松、醋酸泼尼松等）的多级红外光谱鉴定方法。

本标准适用于市售蛋白肽粉类产品的品质快速筛查及其中的蛋白肽和异杂成分的定性鉴别和定量测定。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中：注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB 5009.6—2016 食品安全国家标准 食品中脂肪的测定

GB 5009.8—2016 食品安全国家标准 食品中果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、 乳糖的测定

GB/T 9695.23-2008 肉与肉制品 羟脯氨酸含量测定

GB/T 22492-2008 大豆肽粉

GB/T 22729-2008 海洋鱼低聚肽粉

GB 31645-2018 食品安全国家标准 胶原蛋白肽

GB/T 32198-2015 红外光谱定量分析技术通则

GB/T 32199-2015 红外光谱定性分析技术通则

SB/T 10634-2011 淡水鱼胶原蛋白肽粉

农业农村部公告第 282 号-1-2020 饲料中炔雌醇等 8 种雌激素类药物的测定 液相色谱-串联质谱法

农业部 1068 号公告-2-2008 饲料中 5 种糖皮质激素的测定 高效液相色谱法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1 蛋白肽 protein peptide

以富含蛋白质的动植物及其加工副产物等为主要原料，利用酸法、碱法或酶法等提取方法生产的相对分子质量在10000以下的肽。其中，胶原蛋白肽为以富含胶原蛋白的新鲜动物组织（包括皮、骨、筋、腱、鳞等）为原料，经过提取、水解、精制生产的，相对分子质量低于10000的产品。

3.2 **异杂成分** hetero additives

在产品本身标注之外添加在食品中的可食用物质以及在法律规范允许范围之外添加的非食用物质。

3.3 **定量样品集** calibration samples set

具有代表性的、基本覆盖相关组分含量范围的样品集合。

3.4 **验证样品** validation samples set

用于验证红外模型测定结果的准确性和重复性的样品集。验证样品集不参与定量模型建立。

3.5 **监控样品** monitor samples

用于监测红外光谱仪日常工作稳定性的同品种样品。

3.6 **离群值** outlier

离其他测定值较远的样品测定值，其样品可能与定量模型使用的样品差异较大。

3.7 **异常样品** abnormal samples

出现离群值的样品。

3.8 **定量模型** calibration model

利用化学计量学方法建立的样品红外光谱与对应化学标准值之间关系的数学模型。

3.9 **定量模型验证** calibration model validation

使用验证样品集验证定量模型准确性和重复性的过程。

3.10 **校正集决定系数** coefficient of determination（R^2）

红外光谱法测定值与样本标准值之间相关系数的平方，R^2按照公式（1）计算

$$R^2 = \left[1 - \frac{\sum_{i=1}^{n} (y_i - \hat{y}_i)^2}{\sum_{i=1}^{n} (y_i - \bar{y})^2} \right] \times 100\% \qquad \cdots\cdots (1)$$

式中：

R^2——接近100%表示测定值接近标准值；

n ——校正集的样本数；

y_i——校正集第i个样本的标准值；

$\hat{y}_i$——校正集第i个样本的测定值；

$\bar{y}$——校正集样本参比值的平均值。

3.11 校正均方根误差 Root Mean Squared Error on Calibration（RMSEC）

校正集样本红外光谱测定值与样本标准值之间残差的标准差，RMSEC按照公式（2）计算。

$$RMSEC = \sqrt{\frac{1}{n-p-1}\sum_{j=1}^{n}(y_j - \hat{y}_j)^2} \quad \cdots\cdots (2)$$

式中：

n —— 校正集的样本数；

P —— 回归因子数；

y_j——校正集第j个样本的标准值；

$\hat{y}_j$——校正集第j个样本的测定值。

3.12 预测均方根误差 Root Mean Squared Error on Prediction（RMSEP）

验证集测定过程样本测定值与其标准值之间的标准偏差。RMSEP按照公式（3）进行计算：

$$RMSEP = \sqrt{\frac{1}{n-1}\sum_{i=1}^{n}(y_i - \hat{y}_i)^2} \quad \cdots\cdots (3)$$

式中：

$\hat{y}_i$——验证集第i个样品的测定值；

y_i——验证集第i个样品的标准值；

n——预测集样本总数。

3.13 残余预测偏差 residual prediction deviation（RPD）

验证集标准差与预测均方根误差的比值，RPD按照公式（4）进行计算。

$$RPD = \frac{\text{标准差（SD）}}{\text{预测均方根误差（RMSEP）}} \quad \cdots\cdots (4)$$

式中：

SD——验证集所有样本测定值的标准差。

4 原理

利用多级红外光谱法逐级分析蛋白肽粉产品红外光谱指纹特征，提取对应特征指标峰(群)，结合化学计量学方法构建蛋白肽粉类产品的特征红外光谱与其蛋白肽、蛋白质以及异杂成分含量之间的线性或非线性预测模型，从而实现利用红外光谱信息对蛋白肽粉类产品品质的快速评价。

5 试剂和材料

5.1 除非另有规定，仅使用确认为分析纯的试剂。

5.2 雌酮、乙烯雌酚、倍他米松、醋酸泼尼松标准品。

5.3 市售或利用酸法、碱法或酶法等提取方法生产的肽蛋白肽粉类产品。

6 仪器

6.1 红外光谱仪

红外光谱仪，扫描范围4000 cm^{-1} - 650 cm^{-1}；仪器分辨率优于4 cm^{-1}，基线噪声优于40000:1，基线倾斜优于0.5%T，透过率准确度优于0.5%T，透过率重复性优于0.1%T，吸光度重复性<0.005A。仪器配备衰减全反射（ATR）附件和氘代硫酸三甘肽（DTGS）检测器或汞铬碲（MCT）检测器。

6.2 分析软件

采用6.1红外光谱仪附带的分析软件。

7 检测

7.1 测试前的准备

7.1.1 按照红外光谱仪（6.1）说明书的要求进行仪器的预热和自检测定。

7.1.2 在使用状态下，每天至少使用监控样品对红外光谱仪（6.1）检测一次。监控样品的制备按附录B的规则执行。

7.2 测试要求

7.2.1 仪器及样品制备空间应为配有空调和除湿机的封闭空间。

7.2.2 测定样品的温度应与定量模型样本测定时温度应利用空调保持在 25±3℃。

7.2.3 使用除湿机确保室内湿度低于 20%。

7.2.4 样品状态为固体粉末。

7.3 样品的测定

7.3.1 用 75%乙醇（分析纯）为清洗剂，医用脱脂棉为载体，清洁 ATR 晶体表面。

7.3.2 进行背景扫描，测定空白的 ATR- FTIR 光谱。

7.3.3 进行试样扫描，取约 15 mg±5 mg 蛋白肽粉末试样，放置在 ATR 顶板上，确保两者紧密接触。

7.3.4 扫描次数：8-32 次。

7.3.5 每份试样重新取样测定 3 次。

7.3.6 用红外光谱仪配套软件自动标记峰的位置。

8 定性鉴定结果表示

8.1 蛋白肽红外光谱主要特征峰

蛋白肽的红外光谱应包含以下 11 个特征峰

（1）3279 cm^{-1}、中强峰、宽峰（试样中蛋白肽类、脂类等物质的 N-H 伸缩振动）；

（2）2990-2870 cm^{-1}、中强峰、肩膀峰（试样中脂类中的-CH_2、-CH_3 的对称和反对称伸缩振动）；

（3）1660-1620 cm^{-1}、强峰、尖峰（试样中蛋白肽酰胺Ⅰ带中-COO-反对称伸缩振动和 C=O 伸缩振动）；

（4）1548-1500 cm^{-1}、强峰、尖峰（试样中蛋白肽、脂类中 C-N、C=C 伸缩振动）

（5）1440 cm^{-1}、中强峰、尖峰（试样中蛋白肽-CH_2 的面弯曲振动）

（6）1386 cm^{-1}、中强峰、尖峰（试样脂类中 COO-的对称伸缩振动）

（7）1325 cm^{-1}、弱峰、宽峰（试样中蛋白肽酰胺Ⅲ带的 C-N 伸缩振动和 N-H 面弯曲振动）

（8）1075 cm^{-1}、中强峰、尖峰（试样中糖类的 C-O 伸缩振动）

（9）1038 cm^{-1}、中强峰、尖峰（试样中糖类的 C-C 伸缩振动）

（10）1016 cm^{-1}、中强峰、尖峰（试样中糖类的 C-OH 伸缩振动）

（11）918 cm^{-1}、中强峰、尖峰（试样中糖类的 C-H 伸缩振动）

8.2 蛋白肽中异杂成分的红外光谱主要特征峰

倍他米松、醋酸泼尼松、雌酮、乙烯雌酚四种异杂成分在蛋白肽粉中的特征指纹峰主要位于 3600-2800 cm^{-1}、1750-900 cm^{-1} 范围。应包含以下 8 个主要特征峰：

（1）3435 cm^{-1} 附近、中强峰、宽峰（试样中倍他米松的 O-H 伸缩振动）；

（2）3270 cm^{-1}、中强峰、宽峰（试样中雌酮的 O-H 对称和反对称伸缩振动）；

（3）2805 cm^{-1}、强峰、尖峰（试样中雌酮的 C-H 伸缩振动）；

（4）1660 cm^{-1}、强峰、尖峰（试样中倍他米松、醋酸泼尼松的 C=C 伸缩振动）

（5）1501 cm^{-1}、强峰、尖峰（试样中雌酮、乙烯雌酚的-CH 面弯曲振动）

（6）1429 cm^{-1}、中强峰、尖峰（试样中乙烯雌酚的-CH_2 对称伸缩振动）

（7）1377 cm^{-1}、弱峰、宽峰（试样中乙烯雌酚、醋酸泼尼松的 C-N 伸缩振动）

（8）1218 cm^{-1}、中强峰、尖峰（试样中醋酸泼尼松的-CH 伸缩振动）

9 定量模型

9.1 模型构建

根据测定样品光谱所对应蛋白肽、脂类、总糖、雌酮、乙烯雌酚、倍他米松、醋酸泼尼松含量的标准值，采用偏最小二乘回归（Partial Least Squares Regression, PLSR）建立校正模型，以决定系数（R^2）、校正均方根误差（RMSEC）、预测均方根误差（RMSEP）和残余预测偏差（RPD）作为模型质量的评判指标。

9.2 模型验证

下列情况之一，需对红外分析仪的已有定量模型进行验证：

a）定标模型首次使用时，或定标模型更新后，或更换仪器时；

b）样品来源发生重大改变时；

c）仪器维修或更换光源等配件后；

d）其他需要验证时；

e）每年至少进行2次验证。

10 结果处理与表示

10.1 报告样品中的蛋白肽与异杂成分浓度（单位为ppm），取3次测定值的平均值作为测定结果，精确至小数点后两位。

10.2 测定结果应在定量模型所覆盖的蛋白肽以及异杂成分含量范围内。

10.3 对于仪器报警的异常测定结果，所得数据不应作为有效测定数据。

11 准确性与重现性

11.1 准确性

采用验证样品集进行定量模型准确性验证，验证样品集蛋白肽以及异杂成分含量的测定值与其标准值之间的相对标准偏差（RPD）应不大于3%。对不符合要求不能通过验证的，应查明原因，重新进行验证，直至符合要求。

11.2 重复性

采用验证样品集进行定量模型重复性验证。随机选择3个验证样品，分别测定10次，各样品测定结果的重复性（sr）均应不大于0.5%。对不符合要求、不能通过验证的，应查明原因，重新进行验证，直至符合要求。

11.3 再现性

在不同实验室，由不同操作人员，不同的设备，按相同测试方法，对同一被测样品进行两次测定，获得的蛋白肽以及异杂成分两次测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的7%。

附 录 A
（规范性）

定量的总则和程序

A.1 样品选择

参与定量模型构建的蛋白肽粉样品应具有代表性，应涵盖所要分析样品的特性。用于建模的蛋白肽粉样品采集总数不少于100个，校正样品集数量应不少于样品采集总数的60%，且所有样品的雌酮、乙烯雌酚、倍他米松、醋酸泼尼松含量范围应涵盖待测样品的雌酮、乙烯雌酚、倍他米松、醋酸泼尼松含量范围。

A.2 样品理化测定

蛋白质的含量：按GB/T 24871规定的方法进行测定。

羟脯氨酸的含量：按GBT9695.23规定的方法进行测定。

蛋白肽的含量：按GB/T 22492规定的方法进行测定。

果糖的含量：按GB5009. 8规定的方法进行测定。

脂肪的含量：按GB5009. 6规定的方法进行测定。

雌激素的含量：按农业农村部公告第282号-1-2020规定的方法进行测定。

肾上腺皮质激素的含量：按农业部1068号公告-2-2008规定的方法进行测定。

A.3 样品制备

A.3.1 蛋白肽粉样品应先按照A.2测定雌酮、乙烯雌酚、倍他米松、醋酸泼尼松的含量，所选择的蛋白肽粉样品中不得检出雌酮、乙烯雌酚、倍他米松、醋酸泼尼松。

A.3.2 将雌酮、乙烯雌酚、倍他米松、醋酸泼尼松分别按比例与蛋白肽粉混合，最终浓度范围分别为0 mg/kg、0.5 mg/kg、1 mg/kg、2 mg/kg、5 mg/kg、10 mg/kg、20 mg/kg、50 mg/kg、100 mg/kg（质量分数），粉末样品置于恒温振荡器中，300 rp/min混匀24小时，置于干燥器中室温保存。

A.4 数据处理方法

A.4.1 数据处理

采用红外光谱仪自带的软件进行。

A.4.2 模型优化

定期选用不同类型的代表性样品，按照步骤7.3采集红外光谱并测定样品蛋白质、总糖、脂肪、雌酮、乙烯雌酚、倍他米松、醋酸泼尼松含量参比值，并按照9.1的要求重新建立校正模型并进行模型验证，校准和升级校正模型。

A.4.3 外部验证

A.4.3.1 样品选择

应符合GB/T 27025要求的5个以上实验室测定样品组分的含量。

A.4.3.2 样品组分含量测定

按照7.3测定样品中对应组分含量。

A.4.3.3 测定要求

实验室在接收到样品后应立即进行测定，样品一旦启封，应在当天测定完毕。

A.4.3.4 模型验证

利用t检验判断外部样品预测值与实际值间的显著性，*t*值按照公式（A-1）进行计算：

$$t = \frac{\overline{X} - \mu}{\frac{\sigma_X}{\sqrt{n-1}}} \text{。} \qquad \text{(A-1)}$$

式中：

$\overline{X}$——外部验证样品预测值的平均值；

μ——外部验证样品实际值的平均数；

σ_X——外部验证样品预测值的标准差；

n——外部验证样品总样本数

外部验证样品预测值与实际值应在0.05的显著性水平上无显著性差异。

A.5 待测样品测定

A.5.1 按照步骤7.3采集待测样品的中红外衰减全反射光谱。

A.5.2 将采集的中红外衰减全反射光谱数据代入9.1的模型中，得到待测样品蛋白质、总糖、脂肪、雌酮、乙烯雌酚、倍他米松、醋酸泼尼松含量的测定值。

A.6 异常样品的确认与处理

A.6.1 异常样品的确认

A.6.1.1 形成异常测定结果的原因，来自以下几个方面：

a）该样品中蛋白肽、糖类、脂肪、雌激素、肾上腺皮质激素等含量超过了该仪器定量模型的范围；

b）该样品品种与参与该仪器定量样品集的品种有很大差异；

c）采用了错误的定量模型；

d）样品中杂质过多；

e）光谱扫描过程中样品发生了位移。

f）其他

A.6.1.2 应对造成测定结果异常的原因进行分析和排除，再进行第二次红外光谱测定，仍出现报警则确认为异常样品。

A.6.2 异常样品的处理

按照7.3重新测定。

附 录 B
（规范性）

监控样品的制备

B.1 仪器

红外光谱仪符合本标准6.1的要求。

B.2 监控样品的制备与测定

B.2.1 取样

选择与待测样品比较接近的蛋白肽粉类产品。每份样品3-5g。

B.2.2 样品的测定

利用红外光谱仪（6.1）测定蛋白肽粉样品中蛋白肽的含量以及异杂成分的含量。

B.2.3 监控样品应制备四份。其中三份留作备用。

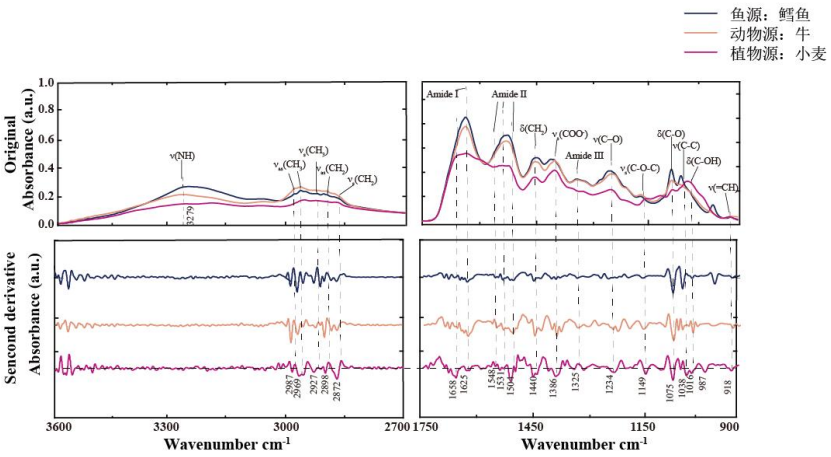
B.3 监控样品的保存

样品应密封避光保存，保存期18个月。

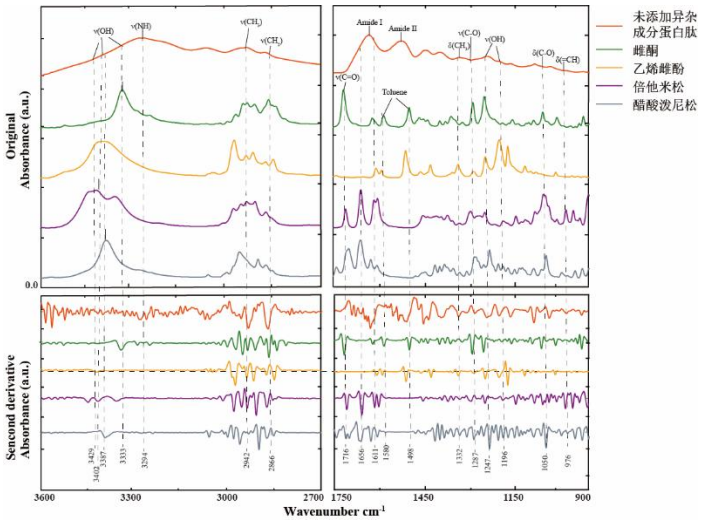
B.4 监控样品的使用期限

监控样品应密封保存于通风、干燥、阴凉的环境中。监控样品出现受潮、被污染、超过保存期等情况时，应换样或重新制备。

附 录 C
（资料性）



图C.1 三种不同来源的蛋白肽的ATR-FTIR谱图与SD-IR谱图



图C.2 未添加异杂成分蛋白肽与四种异杂成分标准品的ATR-FTIR谱图与SD-IR谱图